Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 4, Oct.-Nov. 2023, p. 463-476

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۲ ص. ۴۷۶-۴۶۳

Research Article
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Production of Gelatin Nanoparticles by Solvent Dissolution Method for Use as Food-grade

N. Soleimanpoor Tamam[1], A. Arianfar[2*], V. Hakimzadeh[3], B. Emadzadeh[4]

Received: 2022.02.05
Revised: 2022.06.23
Accepted: 2022.09.11
Available Online: 2022.09.11

How to cite this article:
Soleimanpoor Tamam, N., Arianfar, A., Hakimzadeh, V., & Emadzadeh, B. (2023). Production of gelatin nanoparticles by solvent dissolution method for use as food- grade. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(4), 463-476. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74716.1137

Introduction

Gelatin is one of the most widely used colloidal proteins, which has unique hydrocolloidal property. Gelatin is derived from collagen by changing the thermal nature. This product is widely used in food, pharmaceutical, biomedical, cosmetic and photography industries. Global gelatin demand for food and non-food products is increasing. Two important properties of nanoparticles are: Increasing the surface-to-volume ratio of nanoparticles causes the atoms on the surface to have a much greater effect on their properties than the atoms within the particle volume. The effects of quantum size, which is the second feature. Methods for preparing nanoparticles from natural macromolecules: In general, two major methods for making protein nanoparticles have been reported Emulsion-solvent evaporation method and sedimentation or phase separation method in aqueous medium. Numerous methods have been reported for the preparation of nanoparticles from natural macromolecules. The first method is based on emulsification and the second method is based on phase separation in aqueous medium. In the first method, due to the instability of the emulsion, it is not possible to prepare nanoparticles smaller than 500 nm with a narrow particle size distribution. Therefore, coagulation method or anti-solvent method which is based on phase separation was proposed to prepare nanoparticles from natural macromolecules.

Materials and Methods

Type B (cow) gelatin was purchased from processing company with Bloom 260-240 food and pharmaceutical Iran solvent gelatin solution of 25% aqueous acetate glutaraldehyde from Iran Neutron Company. Two-stage anti-solvent method was used to produce gelatin nanoparticles. Then, to form nanoparticles, acetone was added dropwise while stirring until the dissolved acetone begins to change color and eventually turns white, which indicates the formation of nanoparticles. Finally, glutaraldehyde solution was added for cross-linking and finally centrifuged.

Results and Discussion

The results showed that with increasing gelatin concentration, nanoparticle size and PDI increased significantly. According to the announced results, the solvent has a direct effect on the size. Therefore, the best mixing speed is determined to achieve the smallest particle size. Zeta potential is the best indicator for determining the electrical status of the particle surface and a factor for the stability of the potential of the colloidal system because it indicates the amount of charge accumulation in the immobile layer and the intensity of adsorption of opposite ions on the particle surface. If all the particles in the suspension are negatively or positively charged, the particles tend to repel each other and do not tend to accumulate. The tendency of co-particles to repel each other is directly related to the zeta potential. Fabricated gelatin nanoparticles have a stable structure, and are heat resistant. These nanoparticles are ready to be used to accept a variety of aromatic substances, compounds with high antioxidant properties, a variety of vitamins and heat-sensitive substances.

1, 2 and 3- Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
(*- Corresponding Author Email: a_aria_1443@yahoo.com)
4- Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74716.1137

Conclusion

The results of this study showed that the optimal conditions for the production of a particle of 88.6 nm at 40 ° C, the volume of acetone consumption was 15 ml, concentration 200 mg and speed 1000 rpm, and the morphology of gelatin nanoparticles have resistant, spherical polymer structure and mesh with a smooth surface that can be clearly seen under an electron microscope.

Keywords: Gelatin, Nanoparticle, Optimization, Two-step desolvation method

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۴۷۶-۴۶۳

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 3, Oct.-Nove. 2023, p. 463-476

مقاله پژوهشی

تولید نانو ذرات ژلاتین به روش حلال‌زدایی برای استفاده در صنایع غذایی

نگار سلیمانپورتمام[۱]- اکرم آریان فر[۲]*- وحید حکیم زاده[۳]- بهاره عمادزاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

چکیده

ژلاتین یک پلیمر طبیعی است که به‌طور گسترده در تولید نانو ذرات و در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد در ایجاد ژل، کپسول، قوام‌دهندگی، پایدارکنندگی و امولسیفایری مورداستفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، از ژلاتین تیپ B (گاوی) با بلوم ۲۶۰-۲۴۰ و روش ضد حلال دو مرحله‌ای استفاده شد و در ادامه برای تشکیل نانو ذرات استون به‌صورت قطره‌ای و در حین هم زدن اضافه گردید تا محلول شروع به تغییر رنگ و درنهایت به رنگ سفید درآید که نشان‌دهنده تشکیل شدن نانو ذرات است. در انتها محلول گلوتارآلدهید جهت اتصالات عرضی اضافه و سانتریفوژ شد. همچنین غلظت بهینه ژلاتین، مقدار بهینه از استون مصرفی، و همچنین دما و سرعت مطلوب هم زدن برای تولید نانو ذرات، مشخص گردید. یافته‌های این پژوهش نشان داد که شرایط بهینه برای تولید ذراتی با میانگین اندازه ۸۸/۶ نانومتر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حجم مصرفی استون ۱۵ میلی‌لیتر، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سرعت هم زدن ۱۰۰۰rpm است. در ادامه نتایج حاصل از آزمون‌های طیف‌سنجی مادون قرمز، پراش اشعه ایکس، پتانسیل زتا، آنالیز وزن‌سنجی حرارتی و بررسی مورفولوژی میکروسکوپ‌های الکترونی نشان داد نانو ذرات ژلاتین ساخته‌شده تحت این شرایط به شکل کروی با سطحی صاف بوده که از شبکه پلیمری منسجم و اسکلت مقاومی نسبت به حرارت برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، روش ضد حلال دومرحله‌ای، ژلاتین، نانو ذرات

مقدمه

امروزه ریزپوشانی ترکیبات حساس به حرارت، اسید، آنزیم‌های بزاق و معده و همچنین استرس‌های ناشی از فراوری محصولات غذایی و دارویی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. پلیمرهای سنتزی و طبیعی متنوعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند؛ که در این میان پلیمرهای طبیعی به دلیل منشا طبیعی و غیر سمی بودن آن‌ها، به طور چشمگیری مورداستفاده قرار گرفته‌اند (Kaintura, 2015). یکی از متنوع‌ترین بیوپلیمرهای طبیعی در صنایع دارویی و غذایی ژلاتین است (Eskandari *et al*., 2020). ژلاتین به دلیل طبیعی بودن، زیست تخریب‌پذیری، دسترسی آسان و هزینه کم آن مورد توجه بسیاری از پژوهشگران در زمینه ریزپوشانی قرار گرفته است (Azarmi *et al*., 2006).

در مطالعه‌ای (Kommareddy *et al*., 2007) به منابع جدیدی از حیوانات مانند دوزیستان دست یافتند که برای تولید ژلاتین مورداستفاده قرار گرفته‌اند. عملکرد و خواص ژلاتین‌های مختلف متفاوت هستند فرایندهای تولید آن‌ها شامل پیش‌تصفیه و شرایط استخراج، صاف و خشک شدن در نظر گرفته می‌شود تا کیفیت نهایی ژلاتین را تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به خواص مختلف مولکولی و عملکردی، ژلاتین‌های مختلف برای کاربردهای خاص با مقاصد مختلف استفاده می‌شوند.

۱، ۲ و ۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: a_aria_1443@yahoo.com)
۴- دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، ایران

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74716.1137

این پروتئین از هیدرولیز جزیی کلاژن به دست می‌آید و به دو نوع کاتیونی (ژلاتین نوع A) و آنیونی (ژلاتین نوع B) در دسترس می‌باشد (Gmir, 2012).

نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که نانو ذرات در مقایسه با میکرودرات، از قابلیت جذب مواد مغذی، ویتامین‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است و همچنین در سیستم‌های تحویل دارو، اثر بخشی نانو ذرات بیشتر می‌باشد (Nejat *et* Azarmi *et al*., 2006 ; *al*., 2017).

برای تهیه نانو ذرات از پلیمرهای طبیعی دو روش بر مبنای امولسیون‌سازی و جداسازی فاز در محیط آبی وجود دارد. در اولین روش محلول آبی آلبومین در دمای اتاق در یک روغن گیاهی مانند روغن پنبه‌دانه امولسیونه گردیده و توسط هموژنایزر با فشار بالا و یا توسط امواج اولتراسونیک هموژنیزه می‌گردد. سپس امولسیون تشکیل‌شده قطره‌قطره به داخل مقدار زیاد روغن از پیش حرارت داده‌شده در حال هم زدن افزوده می‌شود. سپس سرد شده و به‌منظور حذف روغن، نانوذرات چندین بار توسط حلال آلی مانند اتانل، استن و یا اتر شستشو داده می‌شوند. این روش به دلیل ناپایداری امولسیون، امکان تولید نانوذرات کوچکتر از ۵۰۰ نانومتر وجود ندارد (Lohcharoenkal *et al*., 2014).

روش دوم که روش ضد حلال نام دارد و مبتنی بر جداسازی فاز می‌باشد، نانو ذرات در محیط آبی توسط روند جداسازی فاز تشکیل‌شده و متعاقباً توسط اتصالات عرضی نظیر گلوتارآلدهید یا فرمالدهید پایدار می‌گردد. در این روش، نانو ذرات با افزودن یک عامل دسولواته کننده نظیر نمک طعام یا اتانل به محلول پروتئین پس از اضافه کردن اتصالات عرضی نظیر گلوتارآلدهید تهیه می‌گردند (Lohcharoenkal *et al*., 2014; Li *et al*., 1997).

علاوه بر روش‌های فوق، روش‌های دیگری نیز برای آماده‌سازی نانو ذرات ژلاتینی بکار گرفته می‌شود که ازجمله می‌توان به میکرو امولسیون، نانورسوب و خودآرایی اشاره کرد. در روش میکروامولسیون که یک روش جدید و مؤثر برای آماده‌سازی نانو ذرات ژلاتین به شمار می آید، محلول آبی ژلاتینی به محلول سورفکتانت و N–هگزان اضافه می‌شود و سپس گلوتارآلدئید برای شبکه‌ای کردن نانو ذرات اضافه‌شده و درنهایت تبخیر N–هگزان برای بازیابی نانو ذرات انجام می‌شود. سورفکتانت زمانی که در حلال غیر قطبی مثل N–هگزان حل می‌شود به شکل میسل، جایی که سر آب‌گریز سورفکتانت به سمت توده حلال و سر آب‌دوست دور از توده حلال در داخل یک هسته آبی محلول آبی ژلاتین و عامل اتصال شده و عرضی قرار می‌گیرد. اندازه هسته داخلی آبی میسل ها در ابعاد نانومتری و در حدود ۵–۵۰nm است. مزیت استفاده از نوع سیستم میکروامولسیون برای تشکیل نانوذرات این است که اندازه نانوذرات می‌تواند توسط تبدیل اندازه هسته آبی میسل‌ها کنترل شود (Gupta *et al*., 2004). نانو رسوب همچنین به‌عنوان روش جایگزینی حلال شناخته می‌شود. این روش شامل رسوب نانوذرات شکل‌گرفته از یک حلال آلی و نفوذ حلال آلی به محیط آبی در حضور یک سورفکتانت است. در این روش، آب به‌عنوان فاز حلال شامل ژلاتین و دارو به‌صورت آرام‌آرام به اتانول به‌عنوان فاز ضد حلال شامل پلوکزامر به‌عنوان پایدارکننده اضافه می‌شود و سپس گلوتارآلدئید عامل اتصال‌دهنده عرضی به نانو ذرات اضافه می‌شود. این روش قادر است نانو ذرات کوچک با توزیع یکنواخت تولید کند (Khan *et al*., 2013). نانو ذرات ژلاتین می‌توانند از طریق خودآرایی مولکول‌های ژلاتین از طریق اصلاح شیمیایی و مخلوط کردن ساده تشکیل شوند. در اصلاح شیمیایی، ژلاتین آب‌دوست با مولکول آبگریز بطور شیمیایی برای تشکیل یک پلیمر دوگانه دوست ترکیب می‌شود. ژلاتین اصلاح شده به صورت آبگریز قادر به تغییر ساختاری به شکل آبی به شکل میسل مانند نانوکره به صورت خودآرایی است، بطوری‌که بخش آبگریز به سمت داخل جمع شده و تشکیل هسته آبگریز با پوسته آب‌دوست می‌دهد (Fung *et al*., 2007). در مخلوط کردن ساده ژلاتین و محلول دارو به صورت مستقیم مخلوط شده و تشکیل نانو ذرات خودآرا را می دهند. با استفاده از این روش، نانو ذرات ژلاتینی حاوی ترکیبات چای ساخته می‌شوند که عمدتا در اینجا پیوند هیدروژنی مسئول تشکیل این نانوذرات است. همچنین برای تشکیل نانوذرات با این روش برهم‌کنش های آبگریز نیز در نظر گرفته می‌شود. مشخص شده است که پروتئین با ساختار سوم فشرده، محل‌های آبگریز کمتری ایجاد می‌کند که برهمکنش با مولکول‌های تانن محدود می‌شود. با این حال، ژلاتین یک پروتئین غنی از پرولین است؛ از این رو، محل‌های بیشتری برای برهمکنش با مولکول تانن با میل بالا فراهم می‌کند (Zheng *et al*., 2011).

روش دوم جهت تهیه نانو ذرات از ماکرو مولکول‌های طبیعی پیشنهاد می‌شود (Narayanan *et al*., 2013). هدف ما در این پژوهش تولید نانوذرات ژلاتین با روش ضد حلال بوده و سپس جهت بهینه کردن اندازه ذرات، عوامل مختلفی مانند غلظت ژلاتین، حجم استون مصرفی، دما و همچنین سرعت هم زدن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ژلاتین تیپ B (گاوی) با بلوم ۲۶۰-۲۴۰ از شرکت فراوری غذایی و دارویی ژلاتین حلال ایران و محلول گلوتارآلدهید ۲۵ درصد آبی و استون از شرکت نوترون ایران تهیه گردید.

تهیه نانو ذرات

به‌منظور تولید نانوذرات ژلاتین، از روش ضد حلال دومرحله‌ای استفاده گردید. در ابتدا ۲۰۰–۵۰۰ میلی‌گرم ژلاتین در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در شرایط دمایی ۱ ±۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله همزن حل شد تا یک محلول شفاف به دست آید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر استون به محلول ژلاتین اضافه گردید تا ژلاتین با وزن مولکولی بالا رسوب کند؛ سپس سوپرناتانت سفید جداسازی شد و به ژلاتین با وزن مولکولی بالا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده گردید. pH محلول ژلاتینی با افزودن اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار بر روی ۲/۵ تنظیم شد. در مرحله بعد، ۳۰ میلی‌لیتر استون به‌صورت قطره‌ای و در حین هم زدن اضافه شد تا محلول به رنگ سفید درآید که نشان‌دهنده تشکیل شدن نانو ذرات بود. در انتها ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول گلوتارآلدهید جهت ایجاد اتصالات عرضی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد (Luo *et al.*, 2012; Nejat *et al.*, 2017).

سنجش اندازه ذره

سنجش اندازه ذره با دستگاه پخش نور دینامیک SZ-100z (Dynamic Light Scattering, HORIBA) انجام شد. قطر مؤثر به‌عنوان اندازه ذره گزارش گردید. برای سنجش دامنه پراکندگی ذرات در مخلوط نیز فاکتور بس پاشیدگی در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها در زاویه پخش ۹۰ درجه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (Hosseini *et al.*, 2013).

طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

در این طرح پژوهشی طیف FT-IR نانو ذرات با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Tensor 27 ساخت شرکت Bruker آلمان با استفاده از قرص KBr ثبت شد.

پراش اشعه ایکس (XRD)

ساختار و اندازه نانوذرات تهیه شده با استفاده از پراش‌سنج اشعه ایکس D500 ساخت شرکت Siemens آلمان با تابش KαCu در محدوده 2θ، ۱۰تا۶۰ درجه ثبت گردید.

آنالیز حرارتی وزن‌سنجی (TGA)

پایداری حرارتی نانو ذرات سنتز شده توسط آنالیز حرارتی وزن سنجی (TGA) ساخت شرکت RIKO ADVANCE ژاپن اندازه‌گیری شده است.

اثر pH بر بار سطحی نانوذرات ژلاتین

برای اندازگیری pH ذرات از دستگاه pH متر (Metrohm 828، ساخت کشور سوئیس) استفاده گردید.

سنجش پتانسیل زتا

به‌منظور تعیین پتانسیل زتا نانو ذرات از دستگاه تفرق نور پویا مدل (Zetasizer- ZS, Malvern, UK) استفاده شد. بدین منظور ذرات در ۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه پخش و در دستگاه قرار داده شد تا اطلاعات لازم ثبت گردد.

تعیین مورفولوژی نانو ذرات

مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (EM3200 KYKY) ساخت کشور آلمان ارزیابی شد. بدین منظور ابتدا محلول نانو ذرات ژلاتین توسط سانتریفیوژ از حلالش جداسازی شد و سپس نانوذرات رسوب کرده به مدت ۰۱ دقیقه در نیتروژن مایع غوطه ور شده و منجمد شد سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک و لایه‌ی بسیار نازکی از طلا به‌عنوان پوشش هادی روی نمونه‌ها نشانده شد و سپس سطح نمونه مورد مطالعه قرار داده شد (Nejat *et al.*, 2017). همچنین تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی با استفاده از AUTOPROBE cp (park scientific Instrument) ثبت شد. نمونه‌ها با چکاندن یک قطره از هر محلول بر روی یک صفحه میکا و خشکاندن آن در دمای محیط آماده‌سازی شدند (Nejat *et al.*, 2017).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از طرح کاملا تصادفی در قالب زمان انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و با نرم‌افزار SAS انجام گرفت. تمامی آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

اثر غلظت ژلاتین بر روی اندازه ذرات

هدف این پژوهش تولید نانوذرات ژلاتین با توزیع اندازه یکنواخت است و بررسی پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که اندازه ذره تحت تأثیر غلظت ماده می‌باشد (Nejat *et al.*, 2017). به همین دلیل، غلظتی از ژلاتین که کمترین شاخص بس‌پاشیدگی را ایجاد نماید به‌عنوان غلظت مطلوب در نظر گرفته شد. از سوی دیگر، نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهند که اندازه‌ی ذرات یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای رهایش طعم در تولید

محصولات نانو درون‌پوشانی شده است و میزان رهایش طعم در مواد غذایی به‌اندازه ذرات و توزیع اندازه آن‌ها بستگی دارد (Nejat *et al.*, 2017). تأثیر غلظت ژلاتین بر روی اندازه ذره و PDI ارزیابی گردید و نتایج در جدول ۱ قابل‌مشاهده است.

جدول ۱- اثر غلظت ژلاتین بر اندازه ذره

Table 1- Effect of gelatin concentration on nanoparticles size

شاخص بس پاشیدگی Polydispersity index (PDI)	اندازه ذره Particle size (nm)	غلظت ژلاتین Concentration of Gelatin (mg)
$0.111^{d} \pm 0.02$	$222.7^{d} \pm 2.83$	200
$0.204^{c} \pm 0.03$	$259.7^{c} \pm 2.75$	300
$0.323^{b} \pm 0.02$	$321.1^{b} \pm 2.76$	400
$0.346^{a} \pm 0.03$	$362.3^{a} \pm 2.69$	500

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.
Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

Polydispersity index یا شاخص بس‌پاشیدگی شاخصی است که توزیع جمعیت اندازه نانو ذرات را نشان می‌دهد؛ هر چه این شاخص پایین‌تر باشد، توزیع اندازه ذرات کوچک‌تر است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود با افزایش غلظت ژلاتین، اندازه نانو ذرات و PDI به‌طور معنی‌داری افزایش‌یافته است. این نتایج با نتایج ارائه شده توسط محققین پیشین مبنی بر اثر غلظت بر اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی مطابقت دارد (Nejat *et al.*, 2017; Elzoghby, 2013). جهانشاهی و همکاران (Jahanshahi *et al.*, 2008) طی مطالعاتی با روش ضد حلال و با استفاده از ژلاتین به تولیدنانو ذرات پرداختند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد با افزایش غلظت ژلاتین، اندازه و PDI نانوذرات تولید شده نیز افزایش می‌یابد. آن‌ها این مشاهده را با ویژگی تشکیل ژل در ژلاتین مرتبط دانستند (Jahanshahi *et al.*, 2008). در این مرحله با توجه به‌اندازه ذره ۲۲۲/۷ نانومتر و PDI برابر ۰/۱۱۱، مطلوب‌ترین غلظت ژلاتین مصرفی برابر ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مدنظر قرار گرفت.

تأثیر حجم استون مصرفی بر اندازه ذرات

تاثیر حجم استون مورداستفاده بر روی اندازه ذره و PDI آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۲ تاثیر مقادیر استون مصرفی بر روی اندازه ذره را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود اثر حلال تاثیر مستقیم بر روی اندازه نهایی ذرات دارد. به‌طورکلی محققین نشان داده اند نانوذراتی که به جای اتانول با استون به‌عنوان ضد حلال تهیه شده‌اند، PDI و همچنین اندازه ذره‌ی کوچک‌تری داشتند. با افزایش حجم استون اندازه ذره و همچنین PDI نیز افزایش‌یافته است (Azarmi *et al.*, 2006). با توجه به نتایج جدول ۲، حجم مناسب استون مصرفی برای تولید نانوذرات، ۱۵ میلی‌لیتر بود که نتیجه آن، دستیابی به‌اندازه ذره ۲۰۶/۳ نانومتر با PDI ۰/۰۸۱ بود. از این مقدار حجم استون در مرحله بعد استفاده شد.

جدول ۲- اثر استون مصرفی بر اندازه ذره

Table 2- Effect of volume of acetone consumed on nanoparticles size

شاخص بس پاشیدگی Polydispersity index (PDI)	اندازه ذره Particle size (nm)	استون مصرفی Acetone consumable (ml)
$0.081^{d} \pm 0.003$	$206^{c} \pm 3.03$	15
$0.090^{c} \pm 0.004$	$214^{b} \pm 4.29$	20
$0.101^{d} \pm 0.002$	$218^{ab} \pm 3.36$	25
$0.112^{a} \pm 0.01$	$226^{a} \pm 2.83$	30

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.
Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

تأثیر دما بر روی اندازه ذرات

با توجه به اینکه ماده مورداستفاده یعنی ژلاتین، ترکیبی پروتئینی است، لذا انجام آزمون‌های پایداری در برابر حرارت ضروری به نظر می رسد؛ زیرا در ترکیبات پروتئینی، دما یکی از عوامل موثر بر اندازه ذرات است. مطابق جدول ۳، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان کمترین و مطلوب‌ترین دما برای تولید نانوذرات تعیین شد و در مرحله بعد مورداستفاده قرار گرفت. دما تاثیر معنی‌داری بر روی اندازه ذرات داشت به‌طوری‌که با افزایش دما، اندازه و PDI ذرات افزایش یافت. ارزیابی‌ها نشان دادند که تولید نانو ذره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد غیرممکن بود چراکه ژلاتین در این دما ژل بسیار ویسکوزی را تشکیل می‌دهد. وقتی‌که دما افزایش می‌یابد ساختار هلیکس سه‌تایی شروع به باز شدن می‌کند و همزمان ویسکوزیته نیز کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد زنجیره‌ها به‌اندازه مطلوب و کافی باز می‌شوند و اضافه کردن استون به‌عنوان ضد حلال در این دما نسبت به دماهای بالاتر منجر به رسوب بهتر ماکرو مولکول‌ها می‌شود (Elzoghby, 2013; Nejat *et al*., 2017). برای درک بیشتر این موضوع باید به بررسی خواص ژلاتینی، ژلاتین پرداخت (Jahanshahi, 2008).

جدول ۳- اثر دما بر اندازه ذره

Table 3- Effect of temperature on nanoparticles size

دما **Temperature (°C)**	اندازه ذره **Particle size (nm)**	شاخص بس‌پاشیدگی **Polydispersity index (PDI)**
40	$201.3^{b} \pm 3.04$	$0.080^{c} \pm 0.003$
50	$232.3^{a} \pm 5.37$	$0.142^{b} \pm 0.004$
60	$240.3^{a} \pm 7.64$	$0.185^{a} \pm 0.006$

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.
Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

تأثیر سرعت هم زدن بر اندازه ذرات

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۴، سرعت هم زدن، از عوامل موثر بر اندازه ذره می‌باشد. بنابراین در این تحقیق جهت تعیین کوچک‌ترین اندازه ذرات ژلاتینی بهترین سرعت هم زدن تعیین شد. داده‌های به‌دست‌آمده در جدول ۴ نشان می‌دهند سرعت هم زدن بر روی اندازه و PDI ذرات تاثیر معنی‌داری داشت و با افزایش سرعت هم زدن اندازه و PDI ذرات به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. کوچک‌ترین اندازه ذره (۸۸/۶ نانومتر) با سرعت هم زدن ۱۰۰۰ rpm به دست آمد که به‌عنوان بهینه سرعت هم زدن برای تولید نانو ذرات ژلاتین در نظر گرفته شد. نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده است که با افزایش سرعت هم زدن، اندازه ذره به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و نانو ذرات بزرگ‌تر در سرعت هم زدن پایین‌تری تشکیل می‌شوند (Gomathi *et al*., 2017).

جدول ٤- اثر سرعت هم زدن بر اندازه ذره

Table 4- Effect of stirring speed on nanoparticles size

سرعت همزنی **Stirring speed (rpm)**	اندازه ذره **Particle size (nm)**	شاخص بس‌پاشیدگی **Polydispersity index (PDI)**
800	$169.4^{a} \pm 4.20$	$0.066^{a} \pm 0.003$
900	$113.7^{b} \pm 5.02$	$0.069^{b} \pm 0.004$
1000	$88.6^{c} \pm 3.53$	$0.043^{c} \pm 0.006$

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

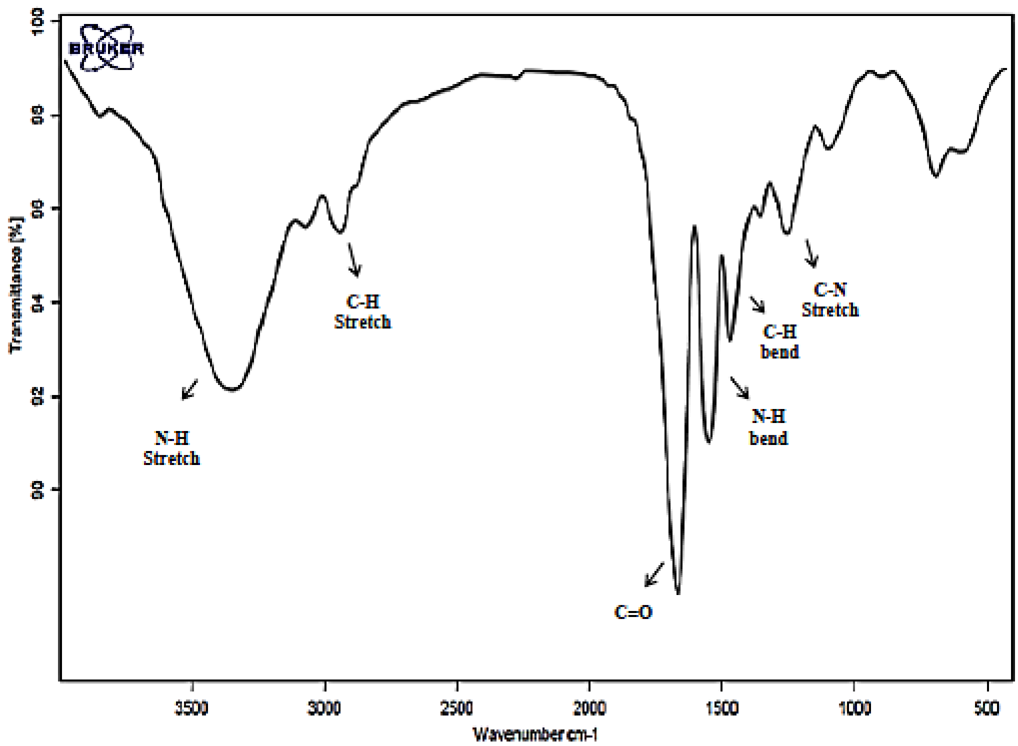
Data are presented as mean values ± standard deviation.
Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

بررسی ویژگی‌های نانو ذره ژلاتینی تهیه شده تحت شرایط مطلوب

در ادامه بررسی، نمونه نانو ذره ژلاتین تهیه شده به روش حلال زدایی که تحت شرایط مطلوب تعیین شده در مرحله قبل، تهیه شده بود مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت.

طیف FT-IR

برای اثبات ساختار شیمیایی نانوذرات ژلاتینی از دستگاه طیف‌سنج مادون‌قرمز استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده‌شده است، پیک پهن موجود در $۳۳۵۴cm^{-1}$ مربوط به گروه آمینی شامل ارتعاشات کششی N-H می‌باشد. پیک موجود در $۲۹۴۳ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی پیوند CH و پیک موجود در $۱۴۵۰cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای CH می‌باشد. پیک‌های مربوط به پیوندهای آمیدی شامل ارتعاش کششی C=O در $۱۶۵۲ cm^{-1}$، ارتعاش خمشی N=H جفت‌شده با ارتعاش کششی پیوند C-N در $۱۵۳۳cm^{-1}$ ظاهر شدند (Ishikawa *et al.*, 2012). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که پیک‌های ظاهرشده در طول‌موج‌های $۱۲۳۰cm^{-1}$ و ۱۳۳۱ مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N بوده که از واکنش گروه‌های آلدهیدی (-CHO) اتصالات عرضی با گروه‌های آمینی ژلاتین ایجاد شدند. پیک‌های ظاهرشده در طول‌موج‌های $۸۷۲ cm^{-1}$ و ۶۶۹ مربوط به ساختار اسکلتی ژلاتین می‌باشد (Nguyen *et al.*, 2010; Kaintura *et al.*, 2015). همچنین وان و همکاران (Wan *et al.*, 2000) دریافتند، مقدار گروه‌های C=O در طول فرآیند اتصال عرضی بدون تغییر باقی می‌ماند.



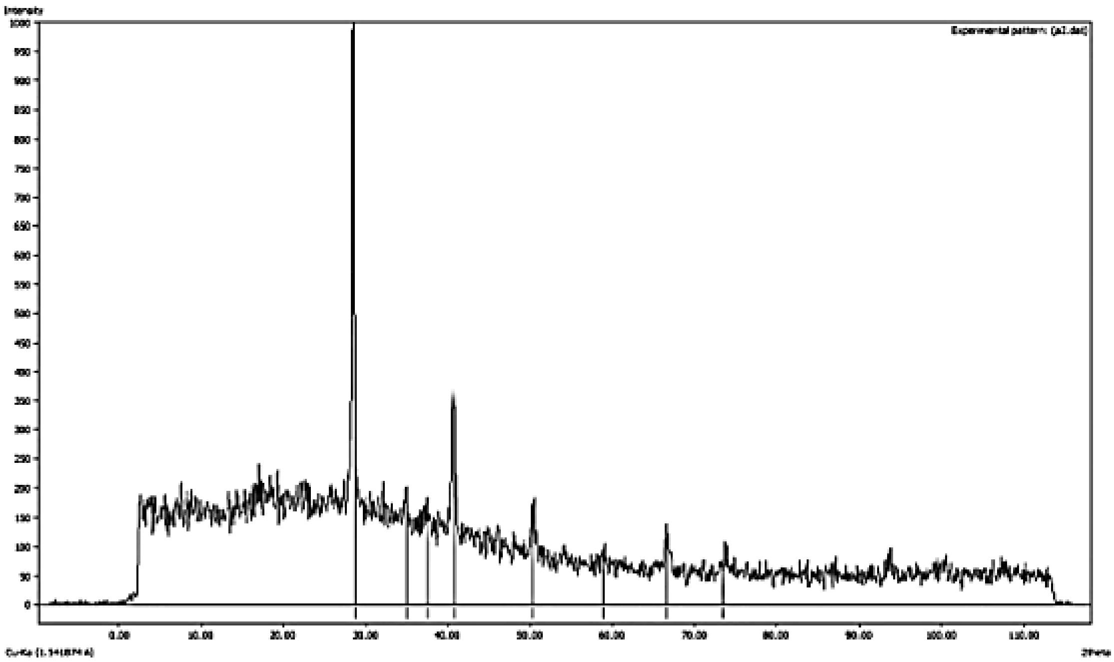
شکل ۱- طیف FT-IR نانوذرات ژلاتین

Figure 1- Spectrum FT-IR Gelatin nanoparticles

بررسی الگوی XRD

الگوی پراش اشعه X به‌منظور درک ویژگی‌های ساختاری ژلاتین مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت، فازهای آمورف (بدون شبکه کریستالی) با این روش شناسایی نمی‌شوند. ژلاتین یک قله XRD کریستالی گسترده را در محدوده 2θ بین ۶۰-۱۰ درجه در شکل ۲ نشان می‌دهد. شدت این قله مربوط به افزایش ساختار کریستالی مارپیچ سه‌گانه کلاژن بازسازی‌شده در ژلاتین می‌باشد. نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که شدت پیک درنتیجه کاتیون‌سازی افزایش می‌یابد که خود به دلیل افزایش میزان پیوندهای هیدروژنی ژلاتین و اثر پروتونه شدن گروه‌های آمینه اولیه می‌باشد. پیک پهن در محدوده °۲۵-۱۵-2θ در طیف XRD نانو

ذرات ژلاتینی به صفحات شبکه پلیمری آن‌ها مربوط می‌شود (Jalaja *et al*., 2015)، که پهن بودن این پیک‌ها نشانگر آمورف بودن یا کریستالیته کم آن‌ها می‌باشد (Yang *et al*., 2015). در پژوهشی مشابه (Gomathi *et al*., 2017) به بررسی خصوصیات نانو ذرات کیتوزان پرداختند، آن‌ها نیز دریافتند عرض پیک پراش اشعه ایکس به‌اندازه کریستالت مرتبط است، پیک پهن‌شده معمولاً از کریستال ناقص ناشی می‌شود.

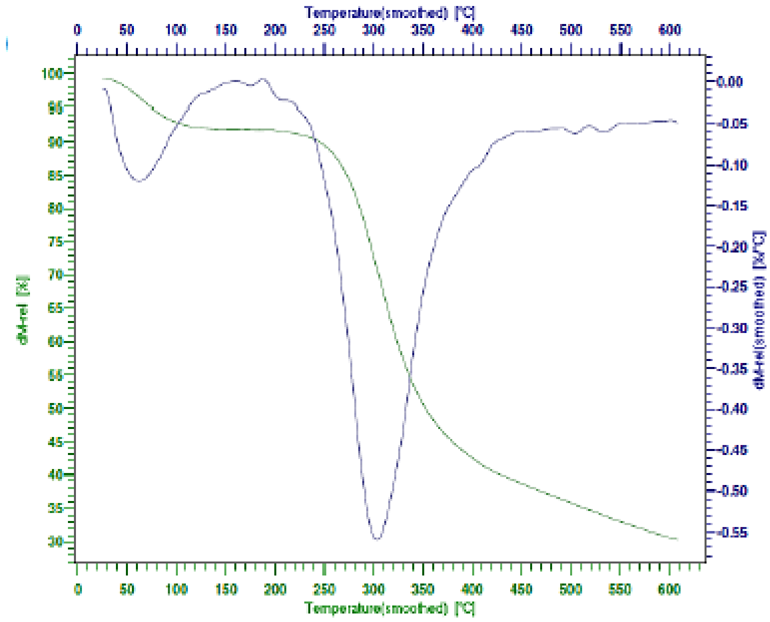


شکل ۲- الگوی XRD نانو ذرات ژلاتین

Figure 2- Pattern XRD Gelatin nanoparticles

آنالیز وزن‌سنجی حرارتی

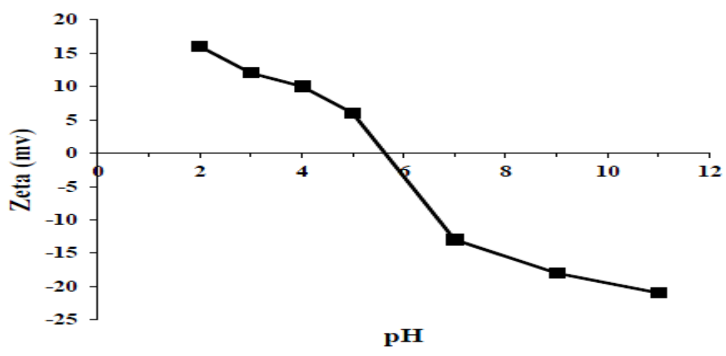
از آنالیز وزن‌سنجی حرارتی، برای اندازه‌گیری جرم نمونه به‌عنوان تابعی از دما استفاده می‌شود. اندازه‌گیری پیوسته افت وزنی در اثر تجزیه یا از دست دادن آب و افزایش وزن به دلیل جذب یا اکسید شدن با استفاده از این دستگاه انجام می‌شود. برخلاف اندازه‌گیری جرمی توسط ترازوی شیمیایی، زمان اندازه‌گیری برای TGA بسیار طولانی است. به همین دلیل پایداری و خواص ضد ارتعاش باید در نظر گرفته شوند. محور افقی، همواره دما را با مقیاس درجه سانتی‌گراد و محور عمودی درصد تغییر وزن را نشان می‌دهد. دماهای آغاز و پایان هر رویداد حرارتی، در منحنی‌ها TGA وابسته به شرایط انجام آزمایش هستند. شکل ۳ بیانگر منحنی‌های وزن‌سنجی حرارتی TGA و مشتق وزن سنجی حرارتی DTG نانو ذرات ژلاتین می‌باشد که شامل تغییرات کاهشی وزن نانوذرات با افزایش دما می‌باشد. استحکام ساختار نانوذرات به عوامل مختلفی مانند مقدار عامل سازنده اتصالات عرضی، زمان حرارت‌دهی، نوع و ترکیب مواد مورداستفاده بستگی دارد. به این دلیل که در تمام مراحل تهیه نانوذرات، مقدار عامل سازنده اتصالات عرضی و زمان حرارت‌دهی یکسان است. با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی مطالعات محققان دمای شروع تخریب نانوذرات ژلاتین ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. در این منحنی‌ها اولین مرحله تخریب در محدوده دمایی ۵۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد که مربوط به از دست دادن مولکول‌های آب جذب‌شده به سطح نانوذرات می‌باشد (Gomathi *et al*., 2017). این امر ماهیت آب‌دوست ژلاتین را ثابت می‌کند، خواص هیدراتاسیون ژلاتین به ساختار اولیه و فوق مولکولی بستگی دارد و حضور آب ترکیبی نیز تأثیر زیادی بر ماهیت چندشکلی کلی ماکرو مولکول‌ها دارد (Rejinold *et al*., 2011). دومین مرحله تخریب در محدوده دمایی ۲۵۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند مربوط به تخریب پلیمر باشد که می‌تواند به فرآیند پیچیده‌ای ازجمله کم‌آبی حلقه آنهیدرو گلوکوزیدی نسبت داده شود (Devika *et al*., 2006; Alavijeh *et al*., 2017).



شکل ۳- نمودارهای وزن‌سنجی (TGA-DTG) نانوذرات ژلاتین
Figure 3- Weighting charts (TGA-DTG) gelatin nanoparticles

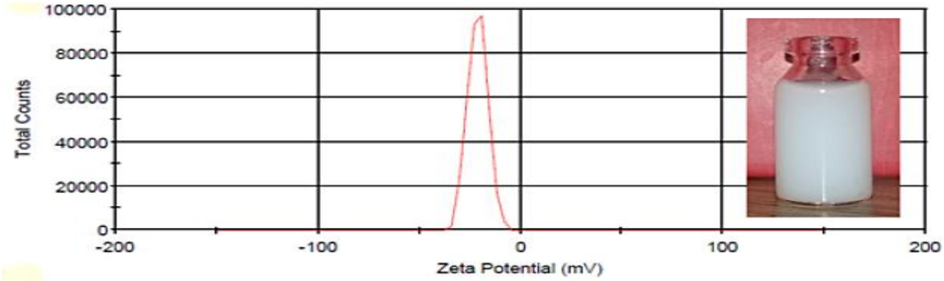
آنالیز پتانسیل زتا

اندازه‌گیری پتانسیل زتا، با روش پراکنش نور لیزری، جهت بررسی پایداری ساختار نانوذرات انجام‌گرفته است. در یک سیستم کلوئیدی، بار موجود در سطح ذرات موجود در سیال، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا شاخصی جهت تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات و عامل ثبات بالقوه‌ی سامانه کلوئیدی است؛ زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است. اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار یکسان باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند؛ بنابراین تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد (Jones, 2010). نتایج حاصل در شکل ۴ تائیدکننده این مطلب است که پروتئین‌ها دارای بار منفی در بالای نقطه ایزوالکتریک خود و بار مثبت زیر این pH هستند (pH ایزوالکتریک نانوذرات ژلاتین حدود ۴/۶ است).

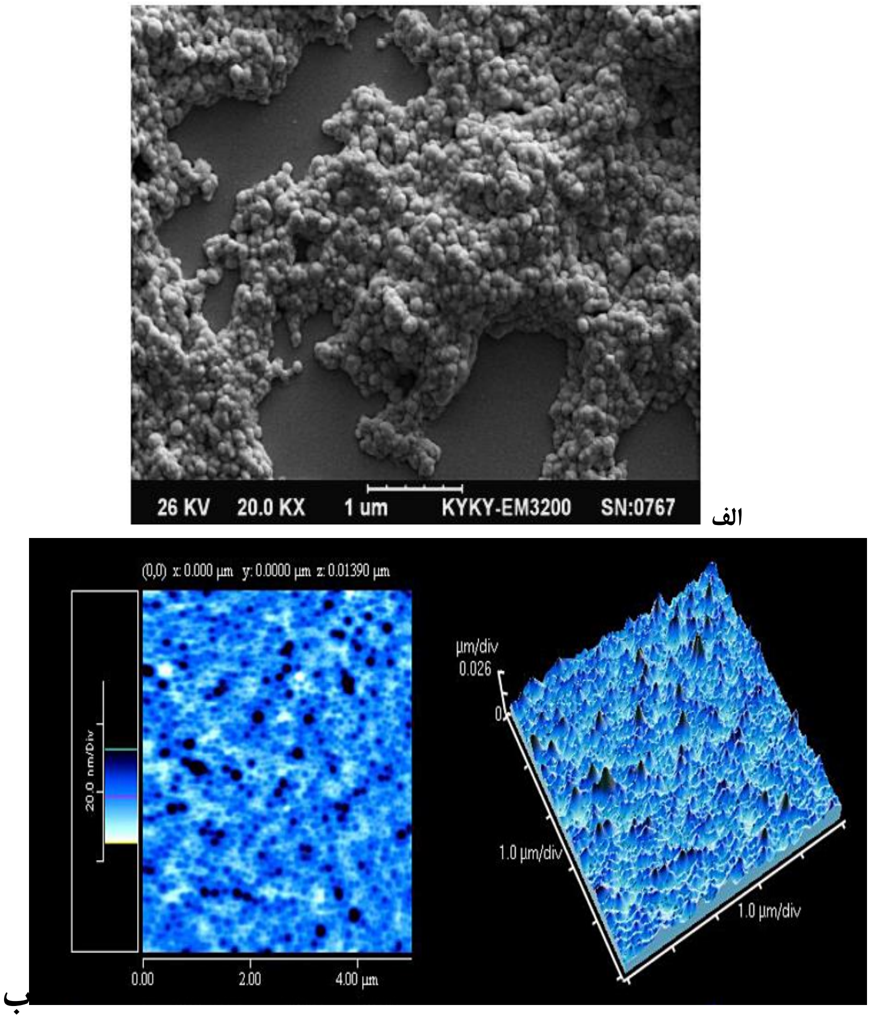


شکل ٤- اثر pH محیط در بار سطحی نانو ذرات ژلاتین
Figure 4- Effect of pH environment in the surface charge of gelatin nanoparticles

به‌طورکلی، مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین نمود. ذراتی که پتانسیل زتای آن‌ها از ۳۰ + میلی‌ولت بیشتر و یا از ۳۰– میلی‌ولت کمتر باشد، پایدار هستند (Shutava, 2009). پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده در حلال آب مقطر اندازه‌گیری شد که همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌کنید، پتانسیل زتا برابر با ۲۱– میلی ولت به‌دست‌آمده است که نشان‌دهنده دانسیته کافی از بار منفی بر سطح می‌باشد و منجر به پایداری کلوئیدی نانوذرات تولید شده می‌شود (Kirby, 2004) .



شکل ۵- نمودار پتانسیل زتا نانوذرات ژلاتین
Figure 5- Zeta potential chart of gelatin nanoparticles



شکل ٦- تصاویر SEM و AFM نانو ذرات ژلاتین
Figure 6- SEM and AFM images of gelatin nanoparticles

بررسی مورفولوژی

مورفولوژی نانو ذرات تولیدشده تحت شرایط مطلوب تعیین شده در بخش نخست این بررسی، توسط دو روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی در شکل ۶ نشان داده شده است. شکل نانوذرات ژلاتین به‌صورت کروی با سطحی صاف می‌باشد که به‌طور جداگانه یا خوشه‌ای پراکنده شده‌اند. این مشاهده با نتایج تحقیقات سایر محققین مطابقت داشت. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که هیچ‌گونه ناهمگنی در سطح ذرات دیده نمی‌شود و ذرات به صورت یکنواخت می‌باشند (Jahanshahi, 2008; Nejat *et al*., 2017).

تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ AFM در شکل ۶ (ب)، نشان داده شد. همان‌طور که در این تصاویر مشخص است، نانوذرات ژلاتینی دارای شکل کاملاً کروی و اندازه ذرات یکنواخت هستند. این عکس به‌وضوح نشان می‌دهد که هیچ ترک مویی یا ناهمگونی روی سطح نانوذرات ظاهر نشده است (Khan *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش تولید نانوذرات ژلاتین با روش ضد حلال و بهینه کردن اندازه ذرات تولید شده از نظر عواملی مانند غلظت ژلاتین، حجم استون مصرفی، دما و سرعت هم زدن می‌باشد. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، شرایط مطلوب برای تولید ذره با اندازه ۸۸/۶ نانومتر، مصرف ۱۵ میلی‌لیتر استون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه می‌باشد. در ادامه خصوصیات و ساختار نانوذرات تهیه شده با استفاده از تکنیک‌های FT-IR، پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی وزن‌سنجی (TGA)، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ‌های الکترونی (SEM, AFM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که نانوذرات ژلاتین ساخته‌شده دارای اسکلت و شبکه پلیمری مقاوم، به صورت کروی دارای سطح صافی است که با میکروسکوپ الکترونی به‌وضوح قابل‌مشاهده است. این نانوذرات، پتانسیل استفاده برای پذیرش انواع مواد معطر، ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، انواع ویتامین‌ها و مواد حساس به حرارت را دارا می‌باشد.

منابع

1. Alavijeh, R., Shokrollahi, P., & Barzin, J. (2017). A thermally and water activated shape memory gelatin physical hydrogel, with a gel point above the physiological temperature, for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, *5*(12), 2302-2314. https://doi.org/10.1039/C7TB00014F
2. Azarmi., S., Abrams, D., Huang, Y., McQuarrie, S., Roa, W., Chen, H., Löbenberg, R., Miller, G.G., & Finlay, W.H. (2006). Optimization of a twostep desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. *Journal Pharmacy Science*, 9(1), 124–132. https://doi.org/10.7939/R3J96097M
3. Devika, R.B., & Varsha, B.P. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note, AAPS Pharm. *Science Technology*, *7*, 1–6. https://doi.org/10.1208/pt070250
4. Elzoghby, O. (2013). Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research, *Journal Control Release*, *172*(3), 1075–1091.
5. Eskandari., Z., & Jafarpour, A. (2020). A comparative study on physio-chemical properties of recovered gelatin from beluga (*Huso huso*) fish skin by enzymatic and chemical methods, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *16*, 157-170. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i1.76991
6. Fung., S.Y., Yang, H., & Chen, P. (2007). Formation of colloidal suspension of hydrophobic compounds with an amphiphilic self-assembling peptide, Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, *55*(2), 200-211. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.12.002
7. GMIA, G.H. (2012). *Gelatin Manufacturers Institute of America*, New York.
8. Gomathi, T., Prasad, P.S., Sudha, P.N., & Anil, S. (2017). Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.057
9. Gupta, A.K., Gupta, M.S., Yarwood, J., & Curtis, A.S.G. (2004). Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts, *Journal of Controlled Release*, *95*(2), 197-207. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.006
10. Hosseini, S.M., Emam-Djomeh, H.Z., Razavi, S.H., Saboury, A.A., Moosavi-Movahedi, A.A., & Atri, Meeren, M.S. (2013). Food Hydrocolloids b -Lactoglobulin e sodium alginate interaction as affected by polysaccharide depolymerization using high intensity ultrasound, *FOOHYD*, *32*(2), 235–244. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.002

11. Ishikawa, H., Nakamura, Y., Jo, J., & Tabata, Y. (2012). Gelatin nanospheres incorporating siRNA for controlled intracellular release, *Biomaterials*, *33*(35), 9097-104. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.032
12. Iida, H., Takayanagi, K., Nakanishi, T., & Osaka, T. (2007). Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis, *Journal of Colloid and Interface Science*, *314*(1), 274-280. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.047
13. Jahanshahi, M., Sanati, M.H., Minuchehr, Z., Hajizadeh, S., & Babaei, Z. (2008). *Controlled fabrication of gelatin nanoparticles as drug carriers*, *Nanotechnol*. Its Appl. First Sharjah Int. Conf., 228, pp. 228–232. https://doi.org/10.1063/1.2776720
14. Jalaja, K., Naskar, D., Kundu, S.C., & James, N.R. (2015). Fabrication of cationized gelatin nanofibers by electrospinning for tissue regeneration. *Rsc Advances*, *5*(109), 89521-89530. https://doi.org/10.1039/C5RA10384C
15. Jones, O., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2010). Thermal analysis of ß-lactoglobulin complexes with pectins. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.001
16. Kirby, B.J., & Hasselbrink, E.F. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, *25*(2), 187-202. https://doi.org/10.1002/elps.200305754
17. Kaintura, R., Sharma, P., Singh, S., Rawat, K., & Solanki, P. (2015). Gelatin nanoparticles as a drug delivery system for proteins, *Journal of Nanomedicine Research*, *2*, 00018. or carrageenan for production of stable biopolymer particles, *Food Hydrocolloids*, *24*(2), 239-248. https://doi.org/10.1007/s10853-015-9287-3
18. Khan, S.A., & Schneider, M. (2013). Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading, *Macromolecular Bioscience*, *13*(4), 455-463. http://doi.org//10.1002/mabi.201200382
19. Kommareddy,S., Shenoy, D.B., & Amiji, M.M. (2007). Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization, Nanotechnologies Lifesci no. september. https://doi.org/10.1002/9783527610419.ntls0011
20. Lohcharoenkal, W., Wang, L., Wang, Y., Chen, C., & Rojanasakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therap Wang,y, BioMed research international. https://doi.org/10.1155/2014/180549
21. Li, J., Li, K., Wang, N., & Wu, X.S. (1997). A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *86*(8), 891-895.
22. Luo, Y., Teng, Z., & Wang, Q. (2012). Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
23. Ma, Y., Zheng, Y., Zeng, X., Jiang, L., Chen, H., Liu, R., Huang, L., & Mei., L. (2011). Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment, *International Journal of Nanomedicine*, *6*(2679), e88. https://doi.org/10.2147/IJN.S25251
24. Nejat, H., Rabiee, M., Tahriri, M., Jazayeri, H.E., Rajadas, J., Ye, H., Cui, Z., & Tayebi, L. (2017). Preparation and characterization of cardamom extract-loaded gelatin nanoparticles as effective targeted drug delivery system to treat glioblastoma. *Reactive and Functional Polymers*, *120*, 46–56. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.09.008
25. Narayanan, D., Koyakutty, G.M.G, L. H, M., Nair, S., & Menon, D. (2013). Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An in vitro and in vivo analysis, Nanomedicine: *Nanotechnology, Biology and Medicine*, *9*(6), 818-828. https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.001
26. Nguyen, T.H., & Lee, B.T. (2010). Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 3(12), 11-17. https://doi.org/10.4236/jbise.2010.312145
27. Rejinold, N.S., Muthunarayanan, M., Muthuchelian, K., Chennazhi, K.P., Nair., S.V., & Jayakumar, R. (2011). Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 407–416.
28. Shutava, T.G., Balkundi, S.S., Vangala, P., Steffan, J.J., Bigelow, R.L., Cardelli, J.A., O'Neal, D.P., & Lvov, Y.M. (2009). Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols, *Journal American Chemical Society*, *3*(7), 1877–1885. https://doi.org/10.1021/nn900451a
29. Yang, L., Jian, W., Qiu, L., Jian, X., Zuo, D., Wang, D., & Yang, L. (2015). One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging, *Nanoscale*, 7(14), 6104-6113. https://doi.org/10.1039/C5NR01080B

30. Y, W., W, Z., L, Y., G.X, C. (2000). Preparation and characterization of gelatin gel with a gradient structure. *Polymer International*, *49*, 1600-1603. https://doi.org/10.1002/1097-0126(200012)49:12<1600::AID-PI554>3.0.CO;2-K